



(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : A61K 47/48		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/33880 A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/33880 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. Juni 2000 (15.06.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/03924 (22) Internationales Anmeldedatum: 3. Dezember 1999 (03.12.99)		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: 198 56 052.4 , 4. Dezember 1998 (04.12.98) DE		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LÖHR, Achim [DE/DE]; Hans-Thoma-Strasse 5, D-69102 Heidelberg (DE). SCHWAB, Manfred [DE/DE]; Mittlerer Rainweg 17-1d, D-69118 Heidelberg (DE).			
(74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler, Trudinger Strasse 246, D-81825 München (DE).			
<p>(54) Title: CONJUGATE USED FOR ENRICHING IN NEURONAL CELLS</p> <p>(54) Bezeichnung: KONJUGAT ZUR ANREICHERUNG IN NEURONALEN ZELLEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a conjugate for introducing active substances into neuronal cells, whereby the conjugate comprises the heavy chain of a toxin of the genus Clostridium and has at least one active substance, whereby the light chain of the toxin is absent. The invention also relates to a method for producing a conjugate of this type, to a kit and to the use of said conjugate.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Konjugat zur Einführung von Wirkstoffen in neuronale Zellen, wobei das Konjugat die schwere Kette eines Toxins der Gattung Clostridium und mindestens einen Wirkstoff umfaßt, wobei die leichte Kette des Toxins abwesend ist. Weiter betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Konjugats, einen Kit und die Verwendung des Konjugats.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Malí	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Konjugat zur Anreicherung in neuronalen Zellen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Konjugat zur Anreicherung in neuronalen Zellen, ein Verfahren zur Herstellung des Konjugats, einen Kit sowie die Verwendung dieser Gegenstände.

Es gibt verschiedenste Krankheiten, die Zellen des zentralen und/oder peripheren Nervensystems betreffen. Beispielsweise seien Morbus Parkinson, Alzheimer Krankheit, Schlaganfall, Hirntumore (z.B. Gliome, Medulloblastome, Astrozytome) oder Neuroblastome, genannt. Das Neuroblastom macht etwa 8-10% aller Krebserkrankungen bei Kindern aus und stellt den häufigsten extrakraniellen soliden Tumor bei Kindern dar. Das Neuroblastom entsteht aus neuroektodermalen Zellen der Neuralleiste. Diese Zellen wandern während der Embryonalentwicklung aus der Neuralleiste aus und bilden das sympathische Nervensystem und das Nebennierenmark. Gesichert gilt inzwischen, daß es bei etwa 30% der höher-malignen Neuroblastomen zu einer Amplifikation von MYC N kommt, wobei die Menge der Amplifikation von MYC N mit der Aggressivität des Tumorwachstums korreliert ist. Insgesamt ist für alle Neuroblastome festzustellen, daß diese durch ein komplexes Krankheitsbild und einen heterogenen Krankheitsverlauf charakterisiert sind. Während es bei einigen Patienten zur spontanen Regression des Tumors kommt, schreitet die Krankheit bei ungefähr der Hälfte der Patienten trotz intensiver Therapie fort. Auch bei Hirntumoren ist die Therapie schwierig. Dies liegt insbesondere daran, daß die meisten Medikamente bestimmte Zellschranken, wie die Blut-Hirn-Schranke, nicht passieren können und überhaupt nicht an den gewünschten Wirkort kommen. Auch radiologische Behandlungen sind lange nicht so erfolgreich wie wünschenswert. Hier wäre eine medikamentöse Vorbehandlung der Tumoren zur Photosensibilisierung sicher dem Erfolg der nachträglichen Strahlenbehandlung zuträglich (photodynamische Therapie). Aber auch

diese scheitert daran, daß keine Wege bereitstehen, wie die Mittel in die erkrankten Zellen gelangen. Die vorstehend aufgezeigte Problematik bei Neuroblastomen und Hirntumoren besteht generell für alle Erkrankungen des Nervensystems, da auch bei anderen Erkrankungen als Krebserkrankungen die therapeutischen und diagnostischen Wirkstoffe nicht effizient in Nervenzellen gelangen.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht nun darin, ein Mittel bereitzustellen, mit dem unterschiedlichste Substanzen bzw. Wirkstoffe in neuronale Zellen eingeführt werden können.

Diese Aufgabe wird durch die Gegenstände der Patentansprüche gelöst.

Von den Erfindern wurde herausgefunden, daß mit einem Konjugat, das die schwere Kette eines Toxins der Gattung Clostridium unterschiedlichste Substanzen bzw. Wirkstoffe mit therapeutischer oder diagnostischer Wirkung in neuronale Zellen transportiert werden können. Die schwere Kette eines Toxins der Gattung Clostridium vermittelt den Wirkstoffen die gewünschte Zellpermeabilität für neuronale Zellen. Erfindungsgemäß sollen unter der "schweren Kette eines Toxins der Gattung Clostridium" auch Fragmente oder Modifikationen (z.B. Austausche, Inversionen, Deletionen oder Insertionen) zu verstehen sein, die aber weiterhin Transporteigenschaften in neuronale Zellen aufweisen. Unter einem "Toxin der Gattung Clostridium" sind beispielsweise das Tetanus-Toxin, Botulinus-Toxin sowie seine Serotypen (A-G) dieser zu verstehen. Dabei ist der primäre Wirkort von Tetanus-Toxin das zentrale Nervensystem und von Botulinus-Toxin das periphere Nervensystem.

Mit Zellpermeabilität wird hier die Eigenschaft von Substanzen bzw. Wirkstoffen bezeichnet, in neuronale Zellen einzudringen. Diese Eigenschaft findet sich naturgegeben allerdings wie bereits oben ausgeführt nur bei wenigen Substanzen. Die meisten Substanzen benötigen Hilfsmittel bzw. Verfahren, um in

Zellen einzudringen. Beispiele hierfür sind Mikroinjektion, Elektroporation, Assoziation mit kationischen Lipiden, Liposomenbildung, Rezeptor-vermittelte Endozytose und Virusinfektion. Diese Hilfsmittel bzw. Verfahren weisen jedoch große Nachteile auf. Insbesondere sind sie teuer, erfordern komplexe Versuchsanordnungen und sind nur begrenzt einsetzbar. Ferner ist ihre Effizienz gering und sie erweisen sich oft als toxisch. Diese Probleme können mit den erfindungsgemäßen Konjugaten umgangen werden. Dies gilt insbesondere deshalb, da nur die nicht-toxische schwere Kette des Toxins verwendet wird und nicht das gesamte Toxin, wie in WO 95/32738, das aus zwei Polypeptidketten (leichte Kette und schwere Kette) aufgebaut ist. Das Toxin der Gattung Clostridium wurde erfindungsgemäß so modifiziert, daß die toxische leichte Kette des Moleküls eliminiert wurde bzw. durch eine Domäne ersetzt wurde, die eine Affinität für die in neuronale Zellen einzubringenden Substanzen verleiht. Von den Erfindern wurde herausgefunden, daß Konjugate, die nur die schwere Kette eines Clostridium-Toxins enthalten, die oben genannte Aufgabe lösen, da die Funktionen der neurospezifischen Bindung und Aufnahme, sowie des Transports und der Freisetzung in das Zytoplasma alle in der Sequenz der schweren Kette kodiert sind. Letzteres ist ein wichtiger Vorteil der schweren Kette gegenüber dem C-Fragment.

Der Ausdruck "Vermittlung von Zellpermeabilität an Substanzen" weist darauf hin, daß die schwere Kette eines Toxins der Gattung Clostridium Zellpermeabilität an Wirkstoffe jeglicher Art und Abstammung vermitteln kann. Die Wirkstoffe können z.B. (Poly)peptide, Proteine, Nukleinsäuren oder chemische Verbindungen sein. Beispiele von Polypeptiden sind Struktur-Polypeptide, Tumornekrosefaktor, Interferone, Interleukine, Lymphokine, Wachstumsfaktoren, Plasmaproteine, z.B. Gerinnungsfaktoren und Stoffwechselenzyme, und Rezeptoren. Insbesondere können die Polypeptide solche sein, welche die Immunogenität von Zellen steigern können. Dies können Polypeptide sein, die Tumorzellen fehlen, z.B. Zytokine, wie IL-2, und GM-CSF, und kostimulatorische Moleküle, wie B7-1,

tumorassoziierte Antigene, z.B. MAGE1, Tyrosinasen und virale Polypeptide, z.B. E7 von humanem Papillomvirus und EBNA-3-Polypeptid von Epstein-Barr-Virus. Ferner können die Polypeptide Adapter-Polypeptide, Oligomerisierungsmotive eines Polypeptids, Polypeptidfragmente von Virus-Hüllpolypeptiden, Hormone und Ribozyme sein. Beispiele von Nukleinsäuren sind solche, die für vorstehende Polypeptide kodieren. Ferner können es Antisense-Oligonukleotide (insbesondere zur Inhibierung von MYC N bei der Behandlung von Neuroblastoma-Tumoren), Peptid-Nukleinsäuren und Consenus-Sequenzen für Transkriptionsfaktoren sein. Beispiele von chemischen Verbindungen sind Arzneimittel, die keine Polypeptid-Struktur aufweisen. Solche können Cytostatika, Anästhetika, Antihistaminika, Antibiotika, photoaktive Substanzen, radioaktive Substanzen, zur Fluoreszenz-fähige Substanzen oder Substanzen für die Fluor-Kernspinspektroskopie. Beispiele der Chemotherapeutika sind Virustatika, Antiprotozoenmittel, Zystostatika und Antibiotika. Vertreter dieser sind z.B. Doxorubicin, Daunorubicin, Tetracycline, Antimetaboliten, wie Methotrexat, und Derivate davon. Beispiele der photoaktiven Substanzen sind Porphyrine, wie o-, m- und/oder p-Tetracarboxyphenylporphyrin (TCPP), Chlorine und Bakteriochlorine. Ein Beispiel der radioaktiven Substanz ist ein mit radioaktivem Jod markiertes Tyrosin. Beispiele der zur Fluoreszenz-fähigen Substanzen sind Fluoreszenzfarbstoffe, wie Fluorescein, Aminofluorescein (AFl), sowie Derivate und Analoga davon. Beispiele der Substanzen für die Fluor-Kernspinspektroskopie sind Polyfluorcarbonsäuren, wie Trifluoressigsäure.

Von vorstehenden Wirkstoffen können einer oder mehrere im erfindungsgemäßen Konjugat vorliegen. Bei mehreren können diese gleich oder verschieden voneinander sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die schwere Ketten eines Toxins der Gattung Clostridium über einen Linker mit dem Wirkstoff verbunden. Die Konjugation mit der schweren Kette kann dabei prinzipiell auf zwei Wegen erreicht werden:

- a) Der zu koppelnde Wirkstoff wird mit einem aminoreaktiven, bispezifischen Crosslinker modifiziert und dabei aktiviert. Nachfolgend reagiert diese modifizierte Molekül über eine aktivierte Disulfidbrücke, die vom Linker stammt, mit der freien SH-Gruppe der schweren Kette und bildet eine kovalente Disulfidbrücke. Dafür geeignete Crosslinker sind SPDP, LC-SPDP oder Sulfo-LC-SPDP; SMPT oder Sulfo-LC-SMPT; SMCC oder Sulfo-SMCC; MBS oder Sulfo-MBS, SIAB oder Sulfo-SIAB, SMPB oder Sulfo-SMPB; GMBS oder Sulfo-GMBS, SIAK oder SIAKK; SIAC oder SIACC, NPIA (alle Fa. Pierce, Rockford, USA)
- b) Die schwere Kette wird durch einen Crosslinker aktiviert, der dann eine Bindung an einen Wirkstoff gewährleistet. Beispielsweise kann die schwere Kette mit NHS-SS-Biotin umgesetzt werden, dann Bindung über Biotin an Avidin oder Streptavidin. Weitere dafür geeignete Linker sind D-Biotin oder Biocytin; NHS-Biotin oder Sulfo-NHS-Biotin, NHS-LC-Biotin oder Sulfo-NHS-LC-Biotin; NHS-Iminobiotin; Sulfo-NHS-SS-Biotin; Biotin-BMCC; Biotin-HPDP; Iodoacetyl-LC-Biotin; Biotin-Hydrazid oder Biotin-LC-Hydrazid, Biocytin-Hydrazid, 5-(Biotinamido)-pentylamin (alle Fa. Pierce, Rockford, USA). Weitere dem Fachmann bekannte Linker können ebenfalls verwendet werden. Der Linker kann am N-Terminus, am C-Terminus, an primären Aminogruppen oder SH-Gruppen vorliegen, wobei auch in der Mitte des Moleküls liegende Aminosäuren modifiziert werden können. Mit der Einstellung des pH-Wertes bei der Reaktion kann die Reaktion so gesteuert werden, daß bevorzugt am N-Terminus modifiziert wird. Aber auch Lysin-Reste sind reaktiv, besonders bei hohem pH-Wert. Gerade im Fall der gewünschten Bindung eines Proteins, Peptids oder Ribozyms als Wirkstoff hat es sich bewährt, die Kopplung an die schwere Kette des Clostridium-Toxins mittels eines chemischen Crosslinkers durchzuführen. Das Vorgehen ist dabei beispielsweise wie folgt. Von einem Toxin, bevorzugt Tetanustoxin (*Clostridium tetani*), wird die schwere Kette mittels isoelektrischer Fokussierung von der leichten Kette abgetrennt (Weller et al., Eur. J. Biochem. 182, S. 649-656 (1989)), wobei sie und in einer harnstoffhaltigen Lösung (z.B. 2 M Harnstoff, 50 mM DTT) vorliegt. Um wieder zu der

natürlichen Konformation zu kommen, wird diese Lösung gegen einen physiologischen Puffer dialysiert. Dabei kommt es spontan zur nativen Disulfidbrückenbildung im C-terminalen Teil, und die Cystein-Gruppe, welche normalerweise die Bindung zur leichten Kette bildet, liegt exponiert am N-Terminus der schweren Kette vor. Um dort die gewünschte Disulfid-Bindung zu erreichen, kann ein bispezifischer Crosslinker, wie Sulfo-LC-SPDP (Fa. Pierce, USA), eingesetzt werden. Im Prinzip läuft die Reaktion so, daß zunächst die zu koppelnde Substanz über eine primäre Aminogruppe mit der NHS-Gruppe des Linkers reagiert und eine stabile Amidbindung erzeugt. Im zweiten Schritt wird das entstandene Konstrukt mit der schweren Kette des Toxins umgesetzt. Dabei erfolgt ein Disulfidaustausch zwischen dem Linker und der SH-Gruppe der schweren Kette des Toxins. Es entsteht dabei eine stabile Disulfidbrücke, die die zu koppelnde Substanz mit der schweren Kette des Toxins verbindet.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform liegt die schwere Kette eines Toxins der Gattung Clostridium in Form eines Fusionspolypeptids vor. Der Ausdruck "schwere Kette eines Toxins der Gattung Clostridium" umfaßt daher auch ein Fusionspolypeptid bzw. -protein, in dem die schwere Kette des Toxins als durchgängiges Polypeptid oder Protein mit einem anderen Polypeptid oder Protein rekombinant hergestellt worden ist. Dieses andere Peptid oder Protein soll der schweren Kette des Toxins bindende Eigenschaften für obige Substanzen verleihen, wobei die Bindung (z.B. im Falle von Nukleinsäuren) über ionische Wechselwirkungen stattfindet. Diese Peptide oder Proteine, die dem Toxin bindende Eigenschaften verleihen, sind insbesondere basische Proteine, wie z.B. das HMG (High Mobility Group)-1 Protein, Histon-Proteine, Protamin, Spermidin oder Polypeptide mit speziellen DNA-Bindemotive, wie z.B. Helix-turn-Helix, Zink-Finger oder Leucin-Zipper.

Eine weitere Möglichkeit, insbesondere zur Anknüpfung von Nukleinsäuren an die schwere Kette, ist die Kopplung eines Oligonukloetids (z.B. über Crosslinker), wobei dieses

Oligonukleotid in der Lage ist, mit speziellen Nukleinsäure-Sequenzen, z.B. auf einem Plasmid, eine sog. Triplehelix zu bilden. Damit werden die Nukleinsäuren über Wasserstoffbrücken mit dem Oligonukleotid an die schwere Kette gebunden. Der Vorteil ist, daß diese Bindung unter physiologischen Bedingungen stabiler ist als ionische Wechselwirkungen.

Die Vermittlung von Zellpermeabilität an Wirkstoffe kann durch übliche Verfahren nachgewiesen werden. Günstig ist es, Zellen mit den Toxin-verbundenen Substanzen zu inkubieren und das Eindringen bzw. Vorliegen der schweren Kette eines Clostridium-Toxins und/oder den Substanzen in den Zellen nachzuweisen. Dies kann z.B. durch spezifische Antikörper (z.B. im Rahmen der Immunfluoreszenz-Methode) oder Reagentien erfolgen, die direkt oder indirekt mit der schweren Kette eines Clostridium-Toxins bzw. den Substanzen reagieren.

Die schwere Kette des Clostridium-Toxins muß vor ihrer Konjugation an die therapeutischen oder diagnostischen Wirkstoffe von der leichten Kette abgetrennt werden. Die Herstellung der schweren Kette erfolgt bevorzugt rekombinant, kann aber auch auf anderen dem Fachmann bekannten Wegen erfolgen.

Ein Weg, den die Verwendung der schweren Kette bietet, ist die native Komposition des Toxins möglichst identisch nachzuahmen, um ein Konstrukt herzustellen, das alle Funktionen des Toxin-Proteins mit Ausnahme der toxischen Eigenschaften besitzt. Dazu wird die leichte Kette des Toxins bevorzugt durch andere Proteine oder Substanzen ersetzt, die wie im nativen Toxin über eine Disulfidbrücke an die schwere Kette gebunden werden.

Nukleinsäuren, wie anti-sense Oligonukleotide, werden bevorzugt an ein Fusionsprotein der schweren Kette eines Clostridium-Toxins gekoppelt. Dies ist ausführlich einem der nachfolgenden Beispiele beschrieben. Solche Konstrukte eignen sich bestens für gentherapeutische Zwecke, z.B. zur Behandlung von

Neuroblastoma-Tumoren, wenn das anti-sense Oligonukleotid z.B. die Expression von MYC N hemmt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit. Ein solcher umfaßt eine oder mehrere der folgenden Komponenten:

- (a) die schwere Kette eines Toxins der Gattung Clostridium
- (b) übliche Hilfsstoffe, wie Träger, Puffer, Lösungsmittel, Kontrollen, etc.

Von den einzelnen Komponenten können jeweils ein oder mehrere Vertreter vorliegen. Hinsichtlich der einzelnen Ausdrücke wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es Zellpermeabilität für neuronale Zellen an Substanzen jeglicher Art und Abstammung zu vermitteln. Auch können die Zellen ex vivo bzw. in vivo vorliegen. Desweiteren löst die Zellpermeabilität keine toxischen Effekte aus.

Die vorliegende Erfindung eignet sich somit bestens für Diagnose und Therapie. Letzteres umfaßt das Eingreifen in die Expression von Genen und in Stoffwechselprozesse. Besonders eignet sich die vorliegende Erfindung für die Diagnose und Therapie schwerster Erkrankungen, z.B. von Tumoren. Ganz besonders zeichnet sich die vorliegende Erfindung dadurch aus, daß sie sowohl für konservative als auch gentherapeutische Behandlungsmaßnahmen eingesetzt werden kann.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Figuren beschrieben.

- Fig. 1: Aufnahme von Konjugaten in Neuroblastom-Zellen
- A1: Dapi-Zellkernfärbung der HDN-16 Zellen von Bild A2
- A2: Avidin-Signale von HDN-16 Zellen, die mit einem Konjugat aus der schweren Kette des Tetanus-Toxin und Avidin inkubiert wurden.

Der Avidin-Nachweis erfolgte durch einen FITC-markierten Sekundärantikörper, der einen spezifischen Avidin-Antikörper erkennt.

- B1: Propidiumjodid-Zellkernfärbung der Kelly-Zellen von Bild B2.
- B2: FITC-Signal von Oligonukleotiden, die mit einem Konjugat aus der schweren Kette des Tetanus-Toxin, Avidin und biotinylierten Oligonukleotiden (FITC-markiert) inkubiert wurden.

- Fig. 2: Nachweis der Aufnahme des full-length-Fusionsproteins aus dem verkürzten HMG-1-Protein und der schweren Kette des Tetanus-Toxin in die Neuroblastom-Zelllinie IMR-32
- A: Dapi-Zellkernfärbung der Zellen von Bild B
- B: Nachweis des Fusionsproteins über einen polyklonalen AK gegen das C-Fragment der schweren Kette des Tetanus-Toxin und einer CY-2 markierten Sekundärantikörper

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Beispiele beschrieben. Die Arbeitsmethoden basieren auf Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, und Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, 1994-1998.

Beispiel 1: Isolation und Klonierung des Gens der schweren Kette des TetanusToxins aus Clostridium tetani

Als Ausgangsmaterial wurde ein lyophilisiertes Bakteriensediment von Clostridium tetani (Massachusetts-Stamm), das von ATCC unter der Nummer ATCC 10709 bezogen wurde, verwendet. Nach der DNA-Extraktion war es das Ziel, mittels der Pfu-Polymerase und nachfolgenden Primern, welche die Restriktionsstellen für die Klonierung einführten, das etwa 2,5 kb große Gen der schweren Kette ohne Mutationen zu

amplifizieren. Dazu wurden folgende Parameter gewählt: große Menge von Ausgangs-DNA (0,5 µg), große Menge Polymerase (10 U), lange Extensionszeiten für die "proof- reading" Funktion der Polymerase (7 min für das 2,5 kb-Gen), geringe Anzahl von Zyklen (5 Zyklen bei 54°C, da in den ersten Zyklen die Restriktionsstellen nicht komplementär sind, dann 15 Zyklen bei 60°C):

PCR-Ansatz:

0,5 µg DNA
25 pmol Klonierungsprimer 1
25 pmol Klonierungsprimer 2
5 µl 10 x Pfu-Puffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,8)
20 mM MgSO ₄
100 mM KCl
100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
1% Triton
1 mg/ml BSA)
10 µl dNTP-Mix
10 U Pfu-Polymerase
ad 50 µl H ₂ O

Klonierungsprimer 1: HCH.FOR
GCATATCCCATGGATTAGGAGAATTTATGTATAAA
NcoI

Klonierungsprimer 2: HCH.REV
TATATACCCGGGATCATTGTCCATCCTTCATCTGT
SmaI

Unter den oben genannten PCR-Bedingungen war es möglich, das erwartete 2,5 kb-Fragment ohne Nebenprodukte zu bilden. Nach einer präparativen Agarosegelektrophorese mit nachfolgender Gelextraktion wurde das DNA-Fragment mit NcoI und SmaI geschnitten und in den gemäß Herstellerangaben vorbereiteten Expressionsvektor pCYB4 (IMPACT-System, New England Biolabs, Beverly, USA) kloniert. Der erhaltene Vektor wurde pCYB4-HCH genannt. Die Klonierung wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Klonierungstechnisch bedingt hatte das rekombinante Protein am C-Terminus zusätzlich die Aminosäuren Glycin und Prolin vor der Intein-Spaltstelle. Am Amino-Terminus war es um drei Aminosäuren im Vergleich zum Wildtyp-Protein verkürzt. Somit

war die erste Aminosäure des rekombinanten Proteins nach dem Formyl-Methionin ein Aspartat. Diese Aminosäure kann in eukaryotischen Zellen für eine Destabilisierung des Proteins sorgen, indem es einen raschen Abbau induziert. Um sicherzustellen, daß die rekombinante schwere Kette nach der Aufnahme von humanen Zellen stabil ist, wurde der Amino-Terminus komplettiert. Dazu wurde über eine NcoI und BseRI Schnittstelle ein Oligoadapter in pCYB4-HCH eingeführt, der für die drei fehlenden aminoterminalen Aminosäuren codiert. Somit bestand die erste Aminosäure nun in einem Serin, die stabilisierend für das Protein ist. Die Klonierung wurde durch Sequenzierung verifiziert.

AD-A 5'-CATGTCATTAACAGATTAGGAGGAATTATGTAT-3'

AD-B 3'-AGTAATTGTCTAAATCCTCCCTTAAATACA-5'

neu: Ser Leu Thr

alt: Asp Leu ... net CSY

Das neue Konstrukt wurde pCYB4-Ad-A+B-HCH genannt.

Als weiteres Expressionssystem wurde das IMPACT T7 System (New England Biolabs, Beverly, USA) eingesetzt. Dieses nutzt im Unterschied zum ursprünglichen System die T7-Polymerase zur Transkription der Expressions-Plasmid. Da auch mit diesem System eine zusätzliche Reinigung über eine N-Terminale His-tag ermöglicht werden sollte, wurde ein entsprechender Adapter in das Expressions-Plasmid pTYB1 kloniert. Der Vektor wurde mit NdeI und XhoI verdaut und der Adapter I + II ligiert.

Ad-1 5'-TATGCACCATCACCATCACCATC-3'

Ad-II 3'-ACGTGGTAGTGGTAGTGGTAGAGCT-5'

His His His His His His His Leu Glu

Die Klonierung wurde durch Sequenzierung verifiziert. Das Konstrukt wurde pTYB1-Ad-I+II genannt.

Das Plasmid pTYB1-Ad-I+II wurde mit SphI veraut, die überhängenden Basen mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt und der

Vektor nochmals mit XbaI verdaut.

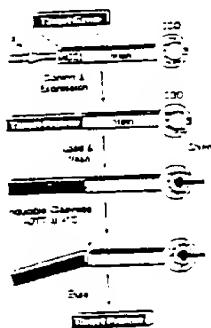
Ausgehend von dem Plasmid pCYB4-Ad-A+B-HCH mit dem kompletten Gen der schweren Kette, wurde für die Klonierung eine PCR mit der Pfu-Polymerase durchgeführt. Damit wurde das Gen der schweren Kette amplifiziert, das am 5'-Ende eine XbaI-Schnittstelle hatte und am 3'-Ende das Codon für Aspartat (letzte Aminosäure wt schwere Kette) mit dem Codon für Serin ausgetauscht hatte. Dieser Aminosäuretausch war nötig geworden, da Aspartat eine totale in vivo-Spaltung des HCH-Intein-Fusionsprotein bewirkt hätte (Manual IMPACT-System). Das PCR-Produkt wurde, nach XbaI-Verdau in den vorbereiteten Vektor pTYB1-Ad-I+II sticky/blunt ligiert. Durch diese Strategie wurde das Gen für die schwere Kette ohne zusätzliche Aminosäure am C-Terminus direkt vor die erste Aminosäure des Inteins kloniert.

Das Konstrukt wurde pTYB1-HCH genannt.

1. Primer: XbaHCH.FOR TATATAACTCGAGTCATTAACAGATTAGGA
 GGAGAATT
2. Primer: BluntHCH-A.REV GCTATTGTCCATCCTTCATCTGTAGGTA-
 CAAGTA

PCR-Parameter

5 min 95°C
 25 Zyklen 1 min 95°C
 1 min 55°C
 7,5 min 72°C
 10 min 72°C, dann 4°C



Prinzip des IMPACT-Systems

Beispiel 2: Expression und Reinigung der schweren Kette des Tetanus-Toxins in E.coli

Aus einer E.coli K12 Bakterienkultur vom pTYB1-HCH wurde eine 200 ml LB-Amp-Übernachtkultur angeimpft. Diese wurde am nächsten Tag zu 800 ml LB-Amp gegeben und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 bis 1,5 geschüttelt. Von diesen Bakterien wurden 50 ml als uninduzierte Probe entnommen und sedimentiert. Zu dem restlichen Ansatz wurde IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM gegeben und die Bakterien bei Raumtemperatur für 4-5 Stunden geschüttelt. Nach der Induktionszeit wurden die Bakterien sedimentiert und konnten bei -20°C gelagert werden. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis oder im Kühlraum durchgeführt.

Die Sedimente, die einer Bakteriensuspension von ca. 250 ml entsprachen, wurden mit 6,25 ml Lysepuffer (20 mM HEPES, pH 8,0 ggf. 2M Harnstoff 500 µM EDTA 0,1 % Triton X-100) resuspendiert. Zur Verhinderung von proteolytischem Abbau wurde COMPLETE-Proteinase Inhibitor (Fa. Boehringer Mannheim) nach Angaben des Herstellers zugegeben. Der Zellaufschluß erfolgte mittels Ultraschall (Branson-Sonifier 250; 5x1 min, 20 % Leistung, mit jeweils 30 sec Pause). Nach der anschließenden Zentrifugation für 30 min bei 12000 g wurde der Überstand auf eine mit Lysepuffer äquilibrierte Chitin-Säule gegeben. Der Durchfluß wurde aufgefangen und nochmals über die Säule gegeben. Der erste Waschschnitt mit dem 4-fach Säulenvolumen erfolgte mit dem Lysepuffer. Es schlossen sich ein Waschschnitt mit dem Waschpuffer 1 (20 mM HEPES, pH 8,0; 500 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 % Triton X-100) (8-faches Säulenvolumen) und Waschpuffer 2 (50 mM BICINE, pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA) (4-faches Säulenvolumen) an. Zur Induktion der Proteinspaltung wurden 3 Säulenvolumen Cleavage Puffer (50 mM BICINE, pH 8,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA, 30 mM β-Mercaptoethanol) über die Säule gegeben und diese dann über Nacht verschlossen. Die Elution erfolgte mit dem Waschpuffer 2 und die Proteinkonzentration wurde mittels des BioRad Detektionssystems bestimmt.

Nach der oben beschriebenen C-terminalen Reinigung der rekombinanten Proteine eluierten Produkte mit heterogener Größe. Als weiteren Reinigungsschritt sollte dashalb das full length Protein, das 6 Histidine am N-Terminus besaß, über eine Ni-Agarose Affinitätsmatrix homogen isoliert werden.

Die Ni-Agarose-Suspension wurde mit dem Waschpuffer 2 (4 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 6,3) äquilibriert. Die Proteinlösung wurde durch das Zugeben des gleichen Volumens von Waschpuffer 1 (8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 6,3) auf eine Harnstoffkonzentration von 4 M eingestellt. Nach Zugabe der Ni-Beads wurde die Suspension in einem Reaktionsgefäß auf einem Taumelrollenmischer bei 4°C für 30-60 min inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in eine leere Säule gefüllt, die durch eine Fritte die Beads zurückhielt. Ungebundene Proteine wurden mit dem 10-fachen Säulenbettvolumen an Waschpuffer 2 entfernt. Vor der Elution wurde der Harnstoff durch den Waschpuffer 3 (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0, 150 mM NaCl) entfernt und der pH auf 8,0 eingestellt. Die gebundenen Proteine wurden durch den Elutionspuffer freigesetzt und aufgefangen.

Beispiel 3: Expression und Reinigung eines Fusionsproteins aus dem HMG-1-Gen und dem Gen der schweren Kette des Tetanus-Toxins

Ein weiteres Ziel war es, das Gen der schweren Kette des Tetanus-Toxins mit einem anderen Gen zu kombinieren, um ein Fusionsprotein mit neuen Eigenschaften zu erhalten. Die Funktionen der schweren Kette, die die zelltypspezifische Bindung, Aufnahme und Freisetzung des Toxins umfassen, sollten durch eine DNA-Bindedomäne ergänzt werden. Zu diesem Zweck wurde das humane Chromatinprotein HMG-1 kloniert.

Die Bezeichnung HMG steht für High Mobility Group und bezieht sich auf das Laufverhalten der Proteine bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Proteine gehören zum nicht-Histon-

Anteil des Chromatins und werden in drei Familien eingeteilt: 1. HMG-1/2; 2. HMG-14/17; 3. HMG-I(Y). HMG-1/2-Proteine werden in allen Zellen exprimiert, ihre genaue Funktion ist allerdings nicht bekannt. Das Molekulargewicht beträgt etwa 25 kDa. Es handelt sich, ähnlich wie bei den Histonen, um Proteine mit stark konservierter Sequenz. So beträgt die Homologie zwischen dem HMG-T der Forelle und dem humanen HMG-1 noch 70%. Charakteristisch für das HMG-1-Protein sind die zwei sogenannten HMG-Boxen A und B, die homolog zu anderen HMG-Proteinen sind. Diese Boxen liegen im N-terminalen Bereich, haben eine Nettoladung von +20 und bewirken eine unspezifische DNA-Bindung. Die Bindung umfaßt ca. 14 bp, wobei die DNA gebogen wird. Im Gegensatz zu den HMG-Boxen ist der C-Terminus negativ geladen, so daß die Gesamtladung bei -5 liegt.

Mittels Datenbankrecherche wurde ein IMAGE-Klon identifiziert, der das gewünschte Gen enthielt. Von dem Ressourcenzentrum Berlin (MPI für Molekulare Genetik) wurde der Klon p998B091570 (clone ID 645032) geliefert.

Mit Hilfe von sequenzspezifischen Primern, die am 5'-Ende eine NcoI- bzw. SmaI-Schnittstelle besaßen, wurde das Gen mit der Pfu-Polymerase amplifiziert.

Ansatz: s. Beispiel 1

Klonierungsprimer 1: HMG-1.FOR
GCATATCCATGGGCAAAGGAGATCCTAAGAA
NcoI

Klonierungsprimer 2: HMG-1a.REV
TATATAGGGCCCTTCATCATCATCATTTCTTC
SmaI

PCR-Parameter 5 min 95°C
5 Zyklen 1 min 95°C
1 min 56°C
7 min 72°C
15 Zyklen 1 min 95°C
1 min 62°C
7 min 72°C
10 min 72°C, dann 4°C

Das Plasmid pCYB4-HCH (s. Bsp. 1) wurde mit NcoI und BseRI verdaut und der Adapter Ad-X+Y eingefügt. Dieser Adapter ermöglichte es, das mit NcoI und SmaI verdaute HMG-1 PCR-Fragment über NcoI und SnaBI (ebenso wie SmaI blunt) in frame vor das Gen der schweren Kette zu ligieren. Ebenso wurde durch den Adapter das 5'-Ende der schweren Kette komplettiert und ein Peptidlinker zwischen den beiden Proteinen eingefügt. Der Peptidlinker hatte folgende Sequenz: Val-Lys-Ser-Ala-Pro-Ser-Gly.

Ad-X

5' - CATGGCGGCCGCTACGTAAAGAGCGCTCCCTGGGGTCATTAACAGA-TTTAGGAGGAATTATGTAT-3'

Ad-Y

3' - C C G C C G G C G A T G C A T T T C T C G C G A G G G A G C C C C A G -TAATTGTCTAAATCCTCCTCTTAATACA-5'

Alle Klonierungen wurden durch Sequenzierung verifiziert. Der Vektor mit dem inserierten Adapter wurde pCYB4-Ad-X+Y-HCH und der Vektor mit dem inserierten HMG-1-Gen pCYB4-HMG-1-HCH genannt. Da das HMG-1 PCR-Fragment vor der Ligation auch mit SmaI verdaut und blunt an den Adapter ligiert wurde, hatte das HMG-1-Protein am C-Terminus zusätzlich noch die Aminosäure Glycin (Codon: GGG). Somit besaß das Fusionsprotein die folgende schematische Sequenz: ATG-wt HMG1-Gly-Val-Lys-Ser-Ala-Pro-Ser-Gly-wt schwere Kette Tetanustoxin-Gly-Pro-Intein-Chitin-Bindeprotein.

Da bei allen Isolaten neben dem Produkt mit der korrekten Größe auch kleinere Fragmente eluiert wurden, sollte der Expressionsvektor derart verändert werden, daß die rekombinanten Proteine zusätzlich über den N-Terminus gereinigt werden konnten. Dazu wurde, ausgehend von dem Vektor pCYB4-Ad-X+Y-HCH, ein Adapter einligiert, der nach dem Startcodon für sechs Histidine codiert und somit eine Reinigung über Metall-Affinitäts-Säulen ermöglichte. Nach den His-Codons befand sich eine Xhol-Schnittstelle. Nach Verdau

mit XbaI und SnaBI konnten somit weitere Gene in frame integriert werden. Der Vektor wurde mit NcoI und SnaBI verdaut und der Adapter sticky/blunt unter Rekonstitution der SnaBI (blunt)-Schnittstelle ligiert.

Ad-HIS-A 5'-CATGCACCATCACCATCGAGGGTGGATAC-3'

Ad-HIS-B 3'-GTGGTAGTGGTAGTGGTAGAGCTCCCACCTATG-5'

His His His His His Leu Glu Gly Gly Tyr

Die Klonierung wurde durch Sequenzierung verifiziert. Dieses Konstrukt wurde pCYB4-HIS-HCH genannt. Auch eine Reinigung der rekombinanten schweren Kette über die His-Tag war mit diesem Plasmid möglich. Dieses Protein hatte zusätzlich zur Wildtyp-Sequenz 18 Aminosäuren am N-Terminus (6xHis-Leu-Glu-Gly-Gly-Tyr-Val-Lys-Ser-Ala-Pro-Ser-Gly).

Zur Konstruktion von HMG-1/schwere Kette-Fusionsproteinen, die zusätzlich über eine aminotermrale His-Tag gereinigt werden können, wurden das HMG-1 Gen mit sequenzspezifischen Primern amplifiziert, die am 5'-Ende eine XbaI-Schnittstelle einführten. Die Prüfer am 3'-Ende des Gens waren komplett komplementär, so daß eine sticky/blunt-Ligation durchgeführt werden konnte. Als weitere Variantion wurde ein am 3'Ende verkürztes Fragment des HMG-1-Gens kloniert, welches nur die DNA-bindenden Domänen (HMG-Box A + B) enthielt. Die PCR wurde mit der Pfu-Polymerase und dem Klon pCYB4-HMG-1-HCH als Matrize durchgeführt.

Primer für komplettes HMG-1-Gen:

XhoHMG-1.FOR	GCATA <u>ACTCGAGGGAAAGGAGATCCTAAGAACCC</u>
XhoHMG-1.REV	TTCATCATCATCATCTTCTTCTTCATCTTCAT

Primer für verkürztes HMG-1-Gen:

XhoHMG-1.FOR	GCATAT <u>CTCGAGGGAAAGGAGATCCTAAGAACCC</u>
DeltaHMG-1.REV	AGCTCGATATGCAGCTATATCCTTTTC

PCR-Parameter

5 min 95°C

25 Zyklen 1 min 95°C
1 min 55°C
1,5 min 72°C
10 min 72°C, dann 4°C

Das Plasmid pCYB4-HIS-HCH wurde mit XbaI und SnaBI verdaut und die PCR-Fragmente nach XbaI-Verdau einligiert. Die Konstrukte wurden pCYB4-His-HMG-1-HCH bzw. pCYB4-His-ΔHMG-1-HCH genannt. Die Klonierungen wurden durch Sequenzierung verifiziert.

Die Herstellung des Fusionsproteins erfolgte mit pCYB4-His-HMG-1-HCH bzw. pCYB4-His-ΔHMG-1-HCH analog Beispiel 2 rekombinant in E. coli.

Beispiel 4: Aufnahme von Proteinkonjugaten in Neuroblastomzellen

Der bispezifische Crosslinker Sulfo-LC-SPDP (Fa. Pierce, Rockford, USA) besitzt eine Amino- und eine SH-reaktive Gruppe.

Das Protein neutrAvidin (Fa. Pierce, USA) lag in einer Konzentration von 5 mg/ml in 50 mM BICINE (Fa. Sigma), pH 8,5; 80 mM NaCl vor. Es handelte sich hierbei im Gegensatz zum Wildtyp um ein Protein ohne Zuckerseitenketten und damit mit neutralem pI-Wert. Dies verhindert die unspezifischen Wechselwirkungen z.B. mit Zellen, die bei dem basischen Wildtyp-Protein vorkommen. Der Crosslinker war in einer Konzentration von 15 mM in DMSO gelöst (Lagerung bei -80°C). 2,5 mg Avidin wurden mit einem dreifachen molaren Überschuß des Crosslinkers für zwei Stunden bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Tris-Puffer pH 8,0 gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde durch eine Gelfiltration über eine G-25 Entsalzungssäule (FPLC) in 50 mM MOPS pH 7,4; 80 mM NaCl überführt und dabei die überschüssigen Crosslinker entfernt. Nach Angaben des Herstellers wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay Kit I (Bio-Rad, München) die Proteinkonzentration der Säulenfraktionen bestimmt und

anschließend durch Reduktion eines Teils des modifizierten Proteins die Anzahl der gekoppelten Linker pro Molekül gemäß Standardmethoden photometrisch bestimmt. Es ergab sich eine Anzahl von 1,9 Linkern pro Avidin-Molekül.

Zunächst wurden die beiden Proteine gekoppelt, um eine Einschleusung von Avidin in Neuroblastom-Zellen über die schwere Kette nachzuweisen. Dazu wurde 1 nmol (= 60 µg) des modifizierten Avidins mit 192 pmol (= 19,2 µg) der schweren Kette von Tetanustoxin in 50 mM MOPS-Puffer, pH 7,4 und 80 mM NaCl bei 4°C für 3 Tage inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde über eine Superdex-200-Gelfiltrationssäule, die mit 50 mM CHES pH 9,5 und 1,5 M NaCl äquilibriert war, aufgetrennt. 100 µl Proben aus den ersten Peakfraktionen wurden für Immunfluoreszenz-Experimente verwendet.

Für diesen Versuch wurde die Neuroblastom-Zelllinie HDN-16 vorbereitet. Die Zellen waren am Vortag des Experiments auf unbeschichtete Glas-Deckgläschchen ($\varnothing = 1$ cm) ausgesät und in 6-Loch-Gefäße (\varnothing je Loch = 3,5 cm) mit je 4 ml Medium überschichtet worden. Vor Beginn des Experiments wurden die Zellen mit Medium gewaschen, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Nachfolgend wurden die Zellen zu 100 µl Elutionsfraktion in 1 ml RPMI-Medium (+ 10% FCS) gegeben und für 5 h ohne Bewegung inkubiert. Alle Schritte der Immunfluoreszenz wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen ausgiebig mit Medium gewaschen und direkt danach fixiert.

Sowohl die Erst- (anti-Avidin, Kaninchen, 2 µg/ml; Rockland, Gilbertsville, USA) als auch die Zweitantikörper (Ziege-anti-Kaninchen-CY-2; 3,3 µg/ml; Rockland, Gilbertsville, USA) wurden mit der Verdünnungslösung (PBS, 0,1% BSA) angesetzt.

Das Volumen betrug 50 µl. Diese Lösung wurde in einem 6-Loch-Gefäß vorgelegt und die Deckgläschchen mit der Zellseite darauf gelegt. Die Inkubationszeit betrug mindestens 30 min,

anschließend wurden die Zellen mit PBS ausgiebig gewaschen.

Zur Färbung des Zellkerns wurden die Zellen für 10 min mit einer Dapi-Lösung (5 ng/ml in 2 x SSC) inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen.

Auf einen Objektträger wurden 15 µl des Mounting-Mediums (2,4 g Mowiol in 6 ml Glycerin, 1 h Röhren, + 6 ml H₂O, 2 h Röhren + 12 ml 0,2 M Tris-HCl, pH 8,5, 50°C mit gelegentlichem Röhren, Zentrifugation: 5000 g für 15 min, Zugabe von 23 mg/ml DABCO; Lagerung von 1 ml Portionen bei -20°C) vorgelegt und die Deckgläschen mit der Zellseite unter Vermeidung von Luftblasen langsam aufgelegt. Die Objektträger wurden waagerecht und abgedunkelt über Nacht zum Auspolymerisieren gelagert. Das erstarrte Einbett-Medium konserviert das Präparat und das beinhaltete Dabco soll das Ausbleichen der Farbstoffe bei der Fluoreszenz-Mikroskopie verhindern. Die Präparate konnten bei 4°C über mehrere Wochen gelagert werden.

Die Präparate wurden mit einem Zeiss Axiophot Epifluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Die Aufnahmen wurden mit einer CCD-Kamera CH250 der Firma Photometrics (München) gemacht und mit der Bildverarbeitungs-Software IPLab-Spectrum 10 (Vers. 3.0) dokumentiert.

In Fig. 1 sind die deutlichen Avidin-Signale zu sehen. Kontrollansätze mit a) Avidin, b) der schweren Kette und c) einem Ansatz mit unmodifizierter Avidin und der schweren Kette in der Konzentration der Elutionsfraktion, erbrachten keine Signale (Daten nicht gezeigt).

Durch dieses Experimentieren wurde der Nachweis erbracht, daß es mit der schweren Kette des Tetanus-Toxins möglich ist, andere Proteine in Neublastom-Zellen zu transportieren.

Beispiel 5: Bindung von Biotin-Oligonukleotiden an das schwere Ketten-Avidin-Konjugat

In weiteren Ansätzen sollte die schwere Kette mit dem modifizierten Avidin gekoppelt werden, um dann an diese Konjugate DNA-Oligonukleotide (15-mer mit zufälliger Sequenz, Fa. MWG Biotech, München) zu binden. Dazu wurde 1 nmol (= 100 µg) der schweren Kette von Tetanustoxin mit 500 pmol (= 30 µg) des modifizierten Avidins (neutrAvidin, Fa. Pierce, Rockford, USA) in 50 mM Hepes pH 8,5 und 150 mM NaCl für 6 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden 50 pmol eines 15mer DNA-Oligonukleotids zugegeben und der Ansatz ohne Bewegung über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Oligonukleotide besaßen an ihrem 3'-Ende eine Biotin-Gruppe, die eine Bindung an Avidin ermöglicht. Am 5'-Ende waren die Oligonukleotide mit einer FITC-Gruppe modifiziert, um so eine eventuelle Aufnahme in Zellen nachweisen zu können. Die Modifikationen der Oligonukleotide waren vom Hersteller bei der Synthese eingeführt worden (Fa. MWG Biotech, München).

Obwohl in den Ansätzen Avidin in einem 10fachen molaren Überschuß vorlag und theoretisch pro Avidin vier Biotin-Bindestellen zur Verfügung standen, sollten noch eventuell vorhandene freie Oligonukleotide aus den Ansätzen entfernt werden, um Versuchsartefakte zu minimieren. Dazu wurden die Ansätze entweder mit magnetischen Beads, die mit Streptavidin gekoppelt waren, inkubiert, oder über eine NickSpin Column (Pharmacia) aufgetrennt. Im ersten Fall wurden die Streptavidin-Beads mit 50 mM Hepes pH 7,4; 150 mM NaCl äquilibriert, die Ansätze zugegeben und für 15 min geschüttelt. Nach der magnetischen Separierung der Beads wurde der Ansatz entnommen. Die NickSpin Columns, die eine Sephadex G-50 Matrix besaßen, wurden mit dem gleichen Puffer äquilibriert und die Ansätze nach den Angaben des Herstellers aufgetrennt. Beide Proben wurden bei den Immunfluoreszenz-Versuchen (analog Beispiel 4) eingesetzt, zeigten aber keinen signifikanten Unterschied in dem Signalmuster (vgl. Fig. 1).

BEISPIEL 6: Aufnahme des HisAHMG-1-HCH Fusionsproteins
 in Neuroblastom-Zellen

Das homogen isolierte Fusionsprotein aus einem verkürzten HMG-1-Protein und der schweren Kette des Tetanus Toxin wurde mit der Neuroblastom-Zelllinie IMR-32 inkubiert, um durch Immunfluoreszenz-Analysen die Aufnahme des Proteins zu testen. Nach einer vierstündigen Inkubation von etwa 0,5 µg des Fusionsproteins in 1,5 ml RPMI-Medium (+ 10 % FCS) wurden die Zellen ausgiebig mit Medium gewaschen, fixiert, mittels Antikörper gegen das C-Fragment des Tetanus-Toxins (1 : 100 - 1 : 300; Fa. Charles River, Southbridge, USA) und einem CY-2 markierten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen-CY-2; Fa Rockland, Gilbertsville, USA) das Fusionsprotein detektiert. In Fig. 2 ist das Resultat des Experiments zu sehen. Es sind sehr starke Signale in fast allen Zellen zu erkennen.

Patentansprüche

- 1) Konjugat zur Einführung von Wirkstoffen in neuronale Zellen, wobei das Konjugat die schwere Kette eines Toxins der Gattung Clostridium und mindestens einen Wirkstoff umfaßt, wobei die leichte Kette des Toxins abwesend ist.
- 2) Konjugat nach Anspruch 1, wobei das Toxin der Gattung Clostridium Tetanus-Toxin oder Botulinus-Toxin ist.
- 3) Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Wirkstoff ausgewählt ist aus (Poly)peptiden, Proteinen, Nukleinsäuren oder chemische Verbindungen.
- 4) Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Wirkstoff und die schwere Kette des Toxins über einen Linker miteinander verbunden sind.
- 5) Konjugat nach Anspruch 4, wobei der Linker NHS-SS-Biotin, NHS-Iminobiotin oder Sulfo-LC-SPDP ist.
- 6) Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die schwere Kette des Toxins als Fusionsprotein vorliegt.
- 7) Konjugat nach Anspruch 6, wobei der Fusionsanteil ein basisches Protein, vorzugsweise humanes HMG-1-Protein, ist.
- 8) Verfahren zur Herstellung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1-7, wobei der Wirkstoff, die schwere Kette eines Toxins der Gattung Clostridium und ggf. ein Linker miteinander umgesetzt werden.
- 9) Kit umfassend eine oder mehrere der folgenden Komponenten:
 - (a) die schwere Kette eines Toxins der Gattung

Clostridium

(b) übliche Hilfsstoffe, wie Träger, Puffer, Lösungsmittel, Kontrollen, etc.

- 10) Verwendung des Konjugats nach einem der Ansprüche 1-7 zur Anreicherung in neuronalen Zellen.
- 11) Verwendung des Konjugats nach Anspruch 10 zur Behandlung und/oder Therapie neuronaler Erkrankungen.
- 12) Verwendung des Konjugats nach Anspruch 10 oder 11 zur gentherapeutischen Behandlung von Neuroblastom-Tumoren.

1/2

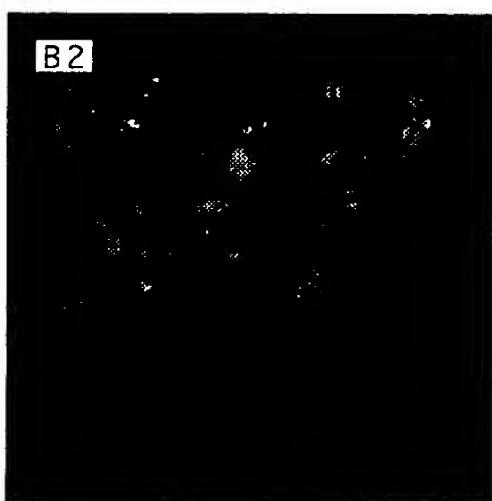
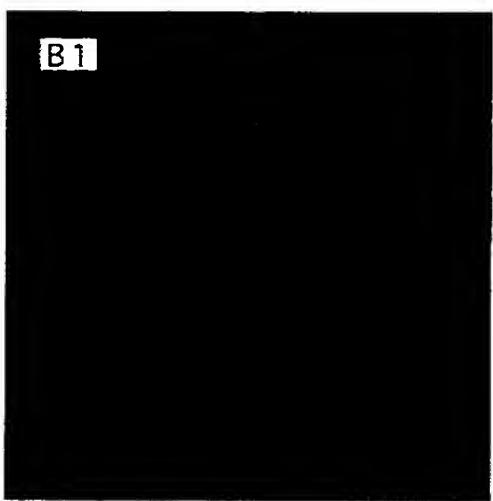
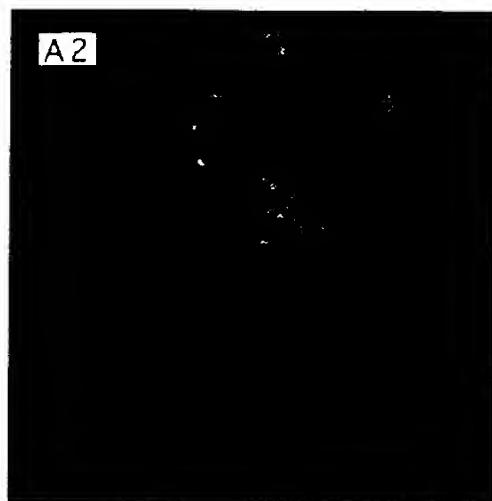
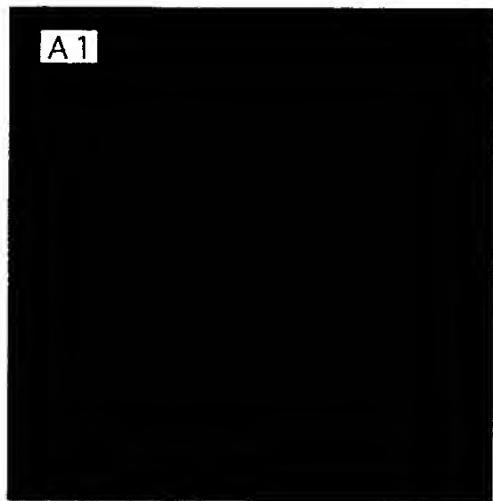


Fig. 1

2/2

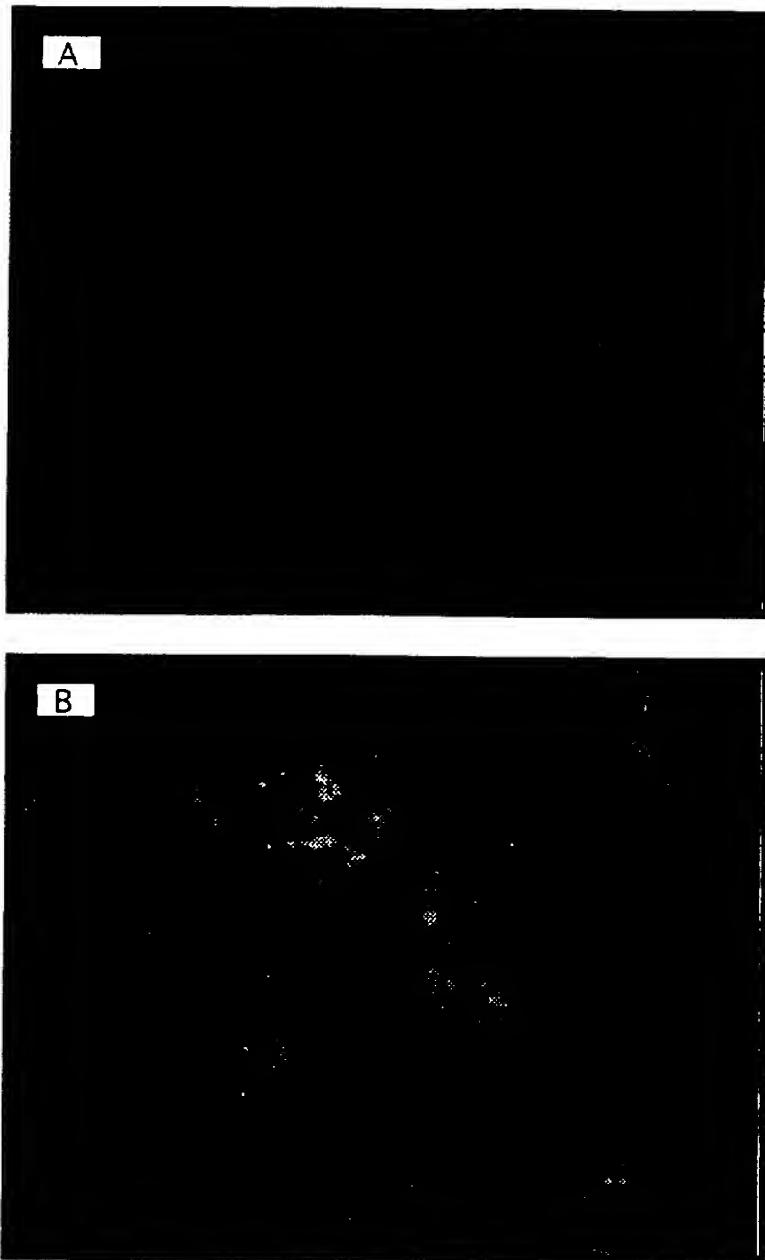


Fig. 2

(19) **FEDERAL REPUBLIC
OF GERMANY** (12) **Patent Application laid open** (51) **Int. Cl.⁷:**
47/48 (10) **DE 198 56 052 A1** **A 61 K**
38/17
48/00 **A 61 K**

**GERMAN
PATENT AND
TRADEMARK OFFICE**

(21) **File number:** 198 56 052.4
(22) **Application date:** 12.4.1998
(43) **Date laid open:** 6.8.2000

(71) **Applicant:** (72) **Inventor:**
Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des Löhr, Achim, 69120
Heidelberg, DE; öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE Schwab, Manfred, 69118
Heidelberg, DE

(74) **Attorney:** (56) **Citations:**
Patent Attorneys, Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea WO 95 32
738 A1
Schüssler, 81825 Munich JOHNSTONE, S.R. et al.: "The
heavy chain of tetanus toxin can mediate
the cytotoxic gelonin [?] into intact
cells", FEBS Letters 265 (1990) 1-2, p.
101-103;
axonal BEAUDE, P. et al.: "Retrograde
transport of an exogenous enzyme
covalently linked to B-IIIb fragment
of tetanus toxin", Biochem. J. (1990)
271, p.
87-91;

**The following information is taken from the documents submitted by the applicant
Examination request filed per § 44 Patent Statute**

(54) Conjugate for accumulation in neuronal cells

(57) The present invention concerns a conjugate for introducing active substances into neuronal cells, the conjugate comprising the heavy chain of a toxin of the Clostridium genus and at least one active ingredient, while the light chain of the toxin is absent. Furthermore, the invention concerns a method for producing such a conjugate, a kit, and the use of the conjugate.

Specification

The present invention concerns a conjugate for accumulation in neuronal cells, a method for preparation of the conjugate, a kit, as well as the use of these objects.

There are many different illnesses which affect cells of the central and/or peripheral nervous system. One can mention Parkinson's disease, Alzheimer's disease, stroke, brain tumors (such as gliomas, medulloblastomas, astrocytomas) or neuroblastomas. Neuroblastoma accounts for around 8-10% of all childhood cancers and represents the most common extracranial solid tumor in children. The neuroblastoma arises from neuroectodermal cells of the neural crest. These cells migrate out from the neural crest during the embryonal development and form the sympathetic nervous system and the adrenal medulla. Meanwhile, it has been found that roughly 30% of the more malignant neuroblastomas show an amplification of MYC N, and the quantity of amplification of MYC N is correlated with the aggressiveness of the tumor growth. What can be said for all neuroblastomas is that they are characterized by a complex clinical picture and a heterogeneous course of the disease. While some patients experience spontaneous remission of the tumor, in roughly half of the patients the disease progresses despite intensive therapy. The treatment of brain tumors is also difficult. This is especially because most medications cannot pass certain cell barriers, such as the blood/brain barrier, and do not even get to the desired target site. And radiological treatments are by no means as successful as is desired. A prior medication treatment of the tumors to make them photosensitive would certainly be beneficial to the success of the subsequent X-ray treatment (photodynamic therapy). Yet this also fails because there is no way to deliver the agent to the diseased cells. The above illustrated problems for neuroblastomas and brain tumors generally obtain for all diseases of the nervous system, since in diseases other than cancer the therapeutic and diagnostic substances do not get efficiently into nerve cells.

Now, the problem of the present invention is to provide a means whereby many different substances or active ingredients can be introduced into neuronal cells.

This problem is solved by the objects of the patent claims.

It has been discovered by the inventors that the heavy chain of a toxin of the Clostridium genus can transport many different substances or active principles with therapeutic or diagnostic effect into neuronal cells with a conjugate. The heavy chain of a toxin of the genus Clostridium provides the active principles the desired cell permeability for neuronal cells. According to the invention, by the "heavy chain of a toxin of the Clostridium genus" is also meant fragments or modifications (e.g., exchanges, inversions, deletions or insertions), yet which continue to exhibit transport properties for neuronal cells. By a "toxin of the Clostridium genus" is meant, for example, the tetanus toxin, botulinus toxin, as well as its serotypes (A-G). The primary site of action of tetanus toxin is the central nervous system and that of botulinus toxin is the peripheral nervous system.

By cell permeability is meant here the property of substances for active principles to penetrate into neuronal cells. In nature, as already explained above, this property is only found in a few substances. Most substances require helping agents or methods to penetrate into cells. Examples of this are microinjection, electroporation, association with cationic lipids, liposome formation, receptor-mediated endocytosis, and virus infection. However, these helping agents and methods have major drawbacks. In particular, they are

costly, require complex experimental arrangements, and only have limited uses. Furthermore, their efficiency is low and they often prove to be toxic. These problems can be circumvented with the conjugates of the invention. This is especially so because only the nontoxic heavy chain of the toxin is used and not the entire toxin, as in WO 95/32738, which is composed of two polypeptide chains (light chain and heavy chain). According to the invention, the toxin of the Clostridium genus has been modified such that the toxic light chain of the molecule has been eliminated or replaced by a domain which confers an affinity for the substances being brought into the neuronal cells. The inventors have discovered that conjugates which contain only the heavy chain of a Clostridium toxin resolve the above-mentioned problem, since the functions of neurospecific binding and uptake, as well as the transport and the release into the cytoplasm, are all coded in the sequence of the heavy chain. This is a major advantage of the heavy chain over the C-fragment.

The term "providing of cell permeability to substances" indicates that the heavy chain of a toxin of the Clostridium genus can provide cell permeability to active principles of whatever type and derivation. For example, the active principles can be (poly)peptides, proteins, nucleic acids or chemical compounds. Examples of polypeptides are structural polypeptides, tumor necrosis factor, interferons, interleukins, lymphokines, growth factors, plasma proteins, such as clotting factors and metabolic enzymes, and receptors. In particular, the polypeptides can be such as boost the immunogenicity of cells. These can be polypeptides which tumor cells lack, such as cytokines like IL-2, and GM-CSF, and costimulatory molecules like B7-1, tumor-associated antigens, such as MAGE1, tyrosinases and viral polypeptides, such as B7 [?] from human papilloma virus and EBNA-3 polypeptide from Epstein-Barr virus. Furthermore, the polypeptides can be adapter polypeptides, oligomerization patterns of a polypeptide, polypeptide fragments of virus sheath polypeptides, hormones and ribozymes. Examples of nucleic acids are those which code for the above polypeptides. Moreover, they can be antisense-oligonucleotides (especially for inhibiting of MYC N in the treatment of neuroblastoma tumors), peptide nucleic acids and consensus sequences for transcription factors. Examples of chemical compounds are pharmaceuticals not having any polypeptide structure. Such can be cytostatics, anesthetics, antihistamines, antibiotics, photoactive substances, radioactive substances, fluorescent substances or substances for fluorine nuclear spin spectroscopy. Examples of chemotherapy agents are virostatics, antiprotozoa agents, cytostatics and antibiotics. Representatives of this group are doxorubicin, daunorubicin, tetracyclines, antimetabolites like methotrexate, and derivatives thereof. Examples of photoactive substances are porphyrins, such as o-, m- and/or p-tetracarboxyphenylporphyrin (TCPP), chlorins and bacteriochlorins. One example of radioactive substances is tyrosine labeled with radioactive iodine. Examples of fluorescing substances are fluorescent dyes, like fluorescein, aminofluorescein (AFI), and derivatives and analogues thereof. Examples of substances for fluorine nuclear spin spectroscopy are polyfluorocarboxylic acids like trifluoracetic acid.

One or more of the above active principles can be present in the conjugate according to the invention. If several are present, they can be the same or different from each other.

In a preferred embodiment, the heavy chain of a toxin of the Clostridium genus is connected to the active principle by a linker. The conjugation with the heavy chain can basically be achieved in two ways:

- a) The active principle being connected is modified with an amino reactive, bispecific cross linker and thereby activated. This modified molecule then reacts via an activated disulfide bridge, part of the linker, with the free SH group of the heavy chain and forms a covalent disulfide bridge. Cross linkers suitable for this are SPDP, LC-SPDP or sulfo-LC-SPDP, SMPT or sulfo-LC-SMPT, SMCC or sulfo-SMCC, MBS or sulfo-MBS, SIAB or sulfo-SIAB, SMPB or sulfo-SMPB, GMBS or sulfo-GMBS, SIAX or SIAXX, SIAC or SIACC, NPIA (all of them from the Pierce Co., Rockford, USA).
- b) The heavy chain is activated by a cross linker, which then provides a bonding to an active principle. For example, the heavy chain can be reacted with NHS-SS-biotin, then binding via biotin to avidin or streptavidin. Other linkers suitable for this are D-biotin or biocytin; NHS-biotin or sulfo-NHS-biotin, NHS-LC-biotin or sulfo-NHS-LC-biotin; NHS-iminobiotin; sulfo-NHS-SS-biotin; biotin-BMCC; biotin-HPDP; iodoacetyl-LC-biotin; biotin-hydrazide or biotin-LC-hydrazine, biocytin-hydrazide, 5-(biotinamido)-pentylamine (all of them from the Pierce Co., Rockford, USA). Other linkers familiar to the practitioner can likewise be used. The linker can be present at the N-terminus, at the C-terminus, at primary amino groups or SH groups, and it is also possible to modify amino acids situated in the middle of the molecule. By adjusting the pH value during the reaction, the reaction can be steered so that modification at the N-terminus is preferred. But lysine residues are also reactive, especially at high pH value. Especially when it is desired to bind a protein, peptide or ribozyme as active principle it has proven advantageous to provide the coupling to the heavy chain of the Clostridium toxin by means of a chemical cross linker. The procedure, for example, is as follows. The heavy chain of a toxin, preferably tetanus toxin (*Clostridium tetani*), is separated from the light chain by means of isoelectric focusing (Weiler et al., Eur. J. Biochem. 182, p. 649-656 (1989)), this being present in a urea-containing solution (such as 2 M urea, 50 mM DTT). In order to restore the natural conformation, this solution is dialyzed against a physiological buffer. This produces a spontaneous formation of the native disulfide bridge at the C-terminal part, and the cysteine group, which normally forms the bond to the light chain, is exposed at the N-terminus of the heavy chain. In order to accomplish the desired disulfide bonding there, a bispecific cross linker like sulfo-LC-SPDP (Pierce Co., USA) can be used. In principle, the reaction occurs such that the substance being coupled is first reacted with the NHS group of the linker via a primary amino group and produces a stable amide bond. In the second step, the resulting construct is reacted with the heavy chain of the toxin. The result is a disulfide exchange between the linker and the SH group of the heavy chain of the toxin. This produces a stable disulfide bridge, which binds the substance being connected to the heavy chain of the toxin.

In another preferred embodiment, the heavy chain of a toxin of the *Clostridium* genus is present in the form of a fusion polypeptide. The term "heavy chain of a toxin of the *Clostridium* genus" therefore also comprises a fusion polypeptide or protein in which the

heavy chain of the toxin is prepared by recombinant techniques as a continuous polypeptide or protein with another polypeptide or protein. This other peptide or protein should confer on the heavy chain of the toxin binding properties for the above substances, with the binding (e.g., in the case of nucleic acids) occurring via ionic interactions. These peptides or proteins which confer binding properties on the toxin are, in particular, basic proteins like the HMG (High Mobility Group)-1 protein, histone proteins, protamine, spermidine or polypeptides with special DNA binding patterns, such as helix-turn-helix, zinc-finger or leucine-zipper.

Another possibility, especially for attaching nucleic acids to the heavy chain, is the coupling of an oligonucleotide (e.g., via cross linker), this oligonucleotide being able to form, with special nucleic acid sequences, such as on a plasmid, a so-called triple helix. This binds the nucleic acids via hydrogen bridges to the oligonucleotide on the heavy chain. The advantage is that this binding under physiological conditions is more stable than ionic interactions.

The providing of cell permeability to active principles can be proven by customary techniques. One can incubate cells with the toxin-connecting substances and demonstrate the penetration or presence of the heavy chain of a Clostridium toxin and/or the substances in the cells. This can be done, for example, by specific antibodies (e.g., the immunofluorescence method) or reagents which react directly or indirectly with the heavy chain of a Clostridium toxin or the substances.

The heavy chain of the Clostridium toxin must be separated from the light chain before its conjugation to the therapeutic or diagnostic active principles. Preparation of the heavy chain is preferably done by recombinant techniques, but can also be done by other ways familiar to the practitioner.

One way offered by the use of the heavy chain is to mimic the native composition of the toxin as closely as possible in order to form a construct which possesses all the functions of the toxin protein with the exception of the toxic properties. For this, the light chain of the toxin is preferably replaced by other proteins or substances that are bound to the heavy chain by a disulfide bridge, as in the native toxin.

Nucleic acids, such as anti-sense oligonucleotides, are preferably coupled to a fusion protein of the heavy chain of a Clostridium toxin. This is described at length [in] one of the following examples. Such constructs are best suited for gene therapy purposes, e.g., for treatment of neuroblastoma tumors, when the anti-sense oligonucleotide inhibits, for example, the expression of MYC N.

Another object of the present invention is a kit. Such a kit contains one or more of the following components:

- (a) the heavy chain of a toxin of the Clostridium genus
- (b) customary adjuvants, like carriers, buffers, solvents, controls, etc.

One or more of the individual components may be present. As regards the individual terms, refer to the above remarks.

The present invention makes it possible to confer cell permeability for neuronal cells on substances of any given kind and origin. The cells can also be present ex vivo or in vivo. Furthermore, the cell permeability does not elicit any toxic effects.

Thus, the present invention is best suited for diagnosis and therapy. The latter includes manipulating the expression of genes and metabolic processes. The present invention is especially suited to the diagnosis and therapy of the most severe diseases, such as tumors. The present invention is distinguished most particularly in that it can be used for both conservative and gene therapy treatment programs.

The invention will be described hereafter by means of the figures.

Figure 1. Uptake of conjugates into neuroblastoma cells

A1 Dapi nuclear staining of HDN-16 cells of figure A2

A2 avidin signals from HDN-16 cells that have been incubated with a conjugate of the heavy chain of tetanus toxin and avidin. The avidin detection was done by a FITC-labeled secondary antibody, which recognizes a specific avidin antibody.

B1 propidium iodide nuclear staining of the Kelly cells of figure B2.

B2 FITC signal of oligonucleotides that were incubated with a conjugate of the heavy chain of tetanus toxin, avidin and biotinylated oligonucleotides (FITC-labeled)

Figure 2. Demonstration of the uptake of the full length fusion protein consisting of the shortened HMG-1 protein and the heavy chain of tetanus toxin into the neuroblastoma cell line IMR-32

A1 Dapi nuclear staining of the cells of figure B

B detection of the fusion protein via a polyclonal antibody against the C-fragment of the heavy chain of tetanus toxin and a CY-2 labeled secondary antibody.

The invention will now be described by means of the examples. The techniques are based on Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, and Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, 1994-1998.

Example

Isolation and cloning of the gene of the heavy chain of tetanus toxin from Clostridium tetani

The starting material was a lyophilized bacterial sediment of Clostridium tetani (Massachusetts strain), which was ordered from the ATCC under the number ATCC 10709. After the DNA extraction, the goal was to amplify the approximately 2.5 kb gene of the heavy chain without mutations by means of Pfu-polymerase and subsequent primers which introduced the restriction sites for the cloning. The following parameters were selected for this: large quantity of starting DNA (0.5 µg), large quantity of polymerase (10 U), long extension times for the "proof-reading" function of the polymerase (7 min. for the 2.5 kb gene), small number of cycles (5 cycles at 54°C, since the restriction sites are not complementary in the first cycles, then 15 cycles at 60°C); PCR batch: 0.5 µg DNA

25 µmol cloning primer 1

25 µmol cloning primer 2

5 µl 10 x Pfu buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.8

20 mM MgSO₄

100 mM KCl

100 mM (NH₄)₂SO₄

expression plasmid pTYB1. The vector was digested with NdeI and Xhol and the adapter I + II was ligated.

Ad-I **5'-TATGCACCATCACCATCACCATC-3'**

Ad-II **3'-ACGTGGTAGTGGTAGTGGTAGAGCT-5'**

The cloning was verified by sequencing. The construct was called pTYB1-Ad-I + II.

The plasmid pTYB1-Ad-I + II was digested with Sapl, the overhanging bases were filled out with the Klenow fragment, and the vector was again digested with Xhol.

Starting with the plasmid pCYB4-Ad-A + B-HCH with the complete gene of the heavy chain, a PCR was carried out for the cloning with the Pfu polymerase. In this way, the gene for the heavy chain was amplified, having a Xhol cutting site at the 5'-end, and at the 3'-end the codon for aspartate (last amino acid wt heavy chain) had been exchanged with the codon for serine. This amino acid exchange became necessary because aspartate had produced a total in vivo cleavage of the HCH-intein-fusion protein (Manual IMPACT system). The PCR product, after Xhol digestion, was sticky/blunt ligated into the prepared vector pTYB1-Ad-I + II. With this strategy, the gene for the heavy chain was cloned directly in front of the first amino acid of the intein without an additional amino acid at the C-terminus.

The construct was called pTYB1-HCH.

1st Primer

XhoHCH.FOR **TATATAACTCGAGTCATTAACAGATTAGGAG-**
GAGAATT

2nd Primer

BluntHCH-A.REV **GCTATTTGTCCATCCTTCATCTGTAGGTA-**
CAAAGTA

PCR Parameters

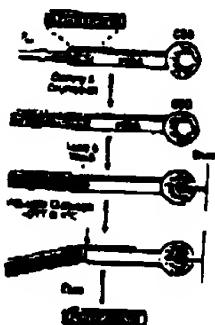
5 min. 95°C

25 cycles 1 min. 95°C

1 min. 55°C

7.5 min. 72°C

10 min. 72°C, then 4°C



1% Triton
1 mg/ml BSA)
10 µl dNTP mix
10 U Pfu polymerase
ad 50 µl H₂O

Cloning primer 1: HCH.FOR

GCATATCCATGGATTTAGGAGGAGAATTATGTATAAA
Ncol

Cloning primer 2: HCH.REV

TATATAACCCGGGATCATTGTCCATCCTTCATCTGT
SmaI

Under the above-mentioned PCR conditions it was possible to form the anticipated 2.5 kb fragment without byproducts. After a preparative agarose gel electrophoresis with subsequent gel extraction, the DNA fragment was cut with Ncol and SmaI and cloned in the expression vector pCYB4 (IMPACT-System, New England Biolabs, Beverly, USA), prepared according to the manufacturer's instructions. The resulting vector was named pCYB4-HCH. The cloning was verified by sequencing.

Due to the cloning technique employed, the recombinant protein also had at the C-terminus the amino acids glycine and proline before the intein cleavage site. The amino-terminus was three amino acids shorter than the wild type protein. Thus, the first amino acid of the recombinant protein after the formyl-methionine was an aspartate. This amino acid can cause a destabilization of the protein in eukaryotic cells by inducing a rapid breakdown. In order to ensure that the recombinant heavy chain is stable after uptake by human cells, the amino-terminus was completed. For this, an oligoadapter was introduced into pCYB4-HCH via a Ncol and BseRI intersection, coding for the three missing amino-terminal amino acids. Thus, the first amino acid now consisted of a serine, which is stabilizing for the protein. The cloning was verified by sequencing.

AD-A **5'-CATGTCATTAACAGATTTAGGAGGAGAATTATGTAT-3'**

AD-B **3'-AGTAATTGTCTAAATCCTCCTCTTAATACA-5'**

new: Ser Leu Thr

old: _____ Asp Leu...

The new construct was called pCYB4-AD-A + B-HCH.

Another expression system used was the IMPACT T7 system (New England Biolabs, Beverly, USA). Unlike the original system, this uses the T7-polymerase for the transcription of the expression plasmid. Since this system as well requires an additional purification via an N-terminal His-tag [?], a corresponding adapter was cloned in the

Principle of the IMPACT System

Example 2: Expression and purification of the heavy chain of tetanus toxin in E. coli

From an E. coli K12 bacterial culture of type pTYB1-HCH, a 200 ml LB-Amp overnight culture was started. This was added the next day to 800 ml LB-Amp and shaken at 37°C until an OD₆₀₀ of 1.0 to 1.5 resulted. From these bacteria, 50 ml were taken and sedimented as an uninduced sample. To the remaining batch, IPTG was added with a final concentration of 1 mM and the bacteria were shaken at room temperature for 4-5 hours. After the induction time, the bacteria were sedimented and could be kept at -20°C. All subsequent steps were carried out on ice or in the cold room.

The sediments, which corresponded to a bacterial suspension of around 250 ml, were resuspended with 6.25 ml lysis buffer (20 mM HEPES, pH 8.0 or 2 M urea 500 µM EDTA 0.1% Triton X-100). In order to prevent proteolytic breakdown, COMPLETE proteinase inhibitor (Boehringer Co. Mannheim) was added according to the manufacturer's instructions. The cells were broken open by ultrasound (Branson Sonifier 250; 5 x 1 min. 20% power, with 30 sec. pause each time). After the following centrifugation for 30 min. at 12,000 g, the supernatant was transferred to a chitin column equilibrated with lysis buffer. The flow-through was captured and placed through the column once again. The first washing step with 4 times the column volume was done with the lysis buffer. Next came a washing step with washing buffer 1 (20 mM HEPES, pH 8.0; 500 mM NaCl; 0.1 mM EDTA; 0.1% Triton X-100) (8 times the column volume) and washing buffer 2 (50 mM BICINE, pH 8.5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA) (4 times the column volume). In order to induce protein cleavage, 3 column volumes of cleavage buffer (50 mM BICINE, pH 8.5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA, 30 mM β-mercaptoethanol) were put through the column and it was then closed over night. Elution was done with washing buffer 2 and the protein concentration was determined by means of the BioRad Detection System.

After the above-described C-terminal purification [,] the recombinant protein [contained?] eluted products of heterogeneous size; therefore, as a further purification step, the full length protein, having 6 histidines at the N-terminus, needed to be homogeneously isolated with a Ni-agarose affinity matrix.

The Ni-agarose suspension was equilibrated with washing buffer 2 (4 M urea, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 6.3). The protein solution was adjusted to a urea concentration of 4 M by adding the identical volume of washing buffer 1 (8 M urea, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 6.3). After adding the Ni-beads, the suspension was incubated in a reaction vessel on a roller mixer at 4°C for 30-60 minutes. Next, the mixture was poured into an empty column, holding back the beads with a frit. Unbound proteins were removed with 10 times the column bed volume of washing buffer 2. Before the elution, the urea was removed with washing buffer 3 (50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0, 150 mM NaCl) and the pH was adjusted to 8.0. The bound proteins were freed up by the elution buffer and captured.

Example 3: Expression and purification of a fusion protein consisting of the HMG-1 gene and the gene for the heavy chain of tetanus toxin

Another goal was to combine the gene of the heavy chain of tetanus toxin with another gene in order to obtain a fusion protein with new properties. The functions of the heavy chain, which include the binding specific to the cell type, the uptake and the release of the toxin, is to be supplemented with a DNA binding domain. For this purpose, the human chromatin protein HMG-1 was cloned.

The designation HMG stands for High Mobility Group and refers to how the protein moves during polyacrylamide gel electrophoresis. The proteins belong to the non-histone part of chromatin and are divided into three families: 1. HMG-1/2; 2. HMG-14/17; 3. HMG-I(Y). HMG-1/2 proteins are expressed in all cells, although their exact function is not known. The molecular weight is around 25 kDa. As with the histones, they are proteins with strongly conserved sequence. Thus, the homology between HMG-T of the trout and human HMG-1 is still 70%. The HMG-1 protein is characterized by the two so-called HMG boxes A and B, which are homologous to other HMG proteins. These boxes lie in the N-terminal region, they have a net charge of +20 and produce a nonspecific DNA binding. The binding comprises around 14 bp, and the DNA is bent. In contrast to the HMG boxes, the C-terminus is negatively charged, so that the overall charge is -5.

Thanks to databank search, an IMAGE clone was identified that contains the desired gene. The clone p998B091570 (clone ID 645032) was delivered by the Resource Center of Berlin (MPI für Molekulare Genetik).

Making use of sequence-specific primers having a NcoI or SmaI cutting site at the 5'-end, the gene was amplified with Pfu polymerase.

Batch: see Example 1

Cloning primer 1: HMG-1.FOR

GCATATCCATGGGCAAAGGAGATCCTAAGAA
NcoI

Cloning primer 2: HMG-1a.REV

TATATAAGGCCCTTCATCATCATCATCTTCTTC
SmaI

PCR parameters 5 min. 95°C

5 cycles 1 min. 95°C

1 min. 56°C

7 min. 72°C

1.5 cycles 1 min. 95°C

1 min. 62°C

7 min. 72°C

10 min. 72°, then 4°C

The plasmid pCYB4-HCH (see Example 1) was digested with NcoI and BseRI and the adapter Ad X + Y was inserted. This adapter made it possible to ligate the HMG-1 PCR fragment digested with NcoI and SmaI in frame before the gene of the heavy chain via NcoI and SnaBI (bluntly, like SmaI). Likewise, the 5'-end of the heavy chain was complemented by the adapter and a peptide linker was introduced between the two proteins. The peptide linker had the following sequence: Val-Lys-Ser-Ala-Pro-Ser-Gly.

5'-CATGGGCGGCCGCTACGTAAAGAGCGCTCCCTGGGGTCATTAACAGA-
TTTAGGAGGAATTATGTAT-3'

Ad-Y

3'-CCGCCGGCGATGCATTCTCGCGAGGGAGCCCCAG-
TAATTGTCTAAATCCTCCTCTTAATACA-5' /

All clonings were verified by sequencing. The vector with the inserted adapter was named pCYB4-Ad-X + Y-HCH and the vector with the inserted HMG-1 gene was named pCYB4-HMG-1-HCH. Since the HMG-1 PCR fragment prior to the ligation was also digested with SmaI and bluntly ligated to the adapter, the HMG-1 protein also had the amino acid glycine (codon: GGG) at the C-terminus. Thus, the fusion protein possessed the following schematic sequence: ATG-wt HMG 1-Gly-Val-Lys-Ser-Ala-Pro-Ser-Gly-wt heavy chain tetanus toxin-Gly-Pro-intein-chitin-binding protein.

Since, besides the product with the correct size, also smaller fragments were eluted in all of the isolates, the expression vector had to be altered so that the recombinant proteins could also be purified via the N-terminus. For this, starting at the vector pCYB4-Ad-X + Y-HCH, an adapter was ligated in, coding for six histidines after the start codon and thus enabling a purification by metal affinity columns. After the His-codon there was a Xhol cutting site. Thus, after digestion with Xhol and SnaBI, it was possible to integrate additional genes into the frame. The vector was digested with NcoI and SnaBI and the adapter was sticky/blunt ligated with reconstitution of the SnaBI (blunt) cutting site.

Ad-HIS-A

5'-CATGCACCATCACCATCACCATCTCGAGGGTGGATAC-3'

Ad-HIS-B

3'-GTGGTAGTGGTAGTGGTAGAGCTCCCACCTATG-5'

His His His His His Leu Glu Gly Gly Tyr

The cloning was verified by sequencing. This construct was called pCYB4-HIS-HCH. A purification of the recombinant heavy chain through the His-tag was also possible with this plasmid. This protein had, in addition to the wild type sequence, 18

amino acids at the N-terminus (6 x His-Leu-Glu-Gly-Gly-Tyr-Val-Lys-Ser-Ala-Pro-Ser-Gly).

In order to construct HMG-1/heavy chain fusion proteins capable of additional purification via an amino-terminal His-tag, the HMG-1 gene was amplified with sequence-specific primers, introducing at the 5'-end a Xhol cutting site. The primers at the 3'-end of the gene were completely complementary, so that it was possible to perform a sticky/blunt ligation. As a further variation, a fragment of the HMG-1 gene shortened at the 3'-end was cloned, containing only the DNA-binding domains (HMG box A + B). The PCR was carried out with Pfu polymerase and the clone pCYB4-HMG-1-HCH as matrix.

Primer for the complete HMG-1 gene

XhoHMG-1.FOR

**GCATAACTCGAGGGGAAAGGAGATCCTAA-
GAAGCC**

XhoHMG-1.REV

TTCATCATCATCATCTTCTTCTTCATCTTCAT

Primer for shortened HMG-1 gene

XhoHMG-1.FOR

**GCATATCTCGAGGGGAAAGGAGATCCTAA-
GAAGCC**

DeltaHMG-1.REV

AGCTCGATATGCAGCTATATCCTTTTC

PCR parameters

5 min. 95°C

25 cycles 1 min. 95°C

1 min. 55°C

1.5 min. 72°C

10 min. 72°, then 4°C

The plasmid pCYB4-HIS-HCH was digested with Xhol and SnaBI and the PCR fragment was ligated in after the Xhol digestion. The constructs were termed pCYB4-His-HMG-1-HCH and pCYB4-His-ΔHMG-1-HCH, respectively. The clonings were verified by sequencing.

The preparation of the fusion protein was done with pCYB4-His-HMG-1-HCH and pCYB4-His-ΔHMG-1-HCH, similar to example 2, recombinantly in E. coli.

Example 4: Uptake of protein conjugates in neuroblastoma cells

The bispecific cross linker sulfo-LC-SPDP (Pierce Co., Rockford, USA) possesses an amino and a SH-reactive group.

The protein neutrAvidin (Pierce Co., USA) was present in a concentration of 5 mg/ml in 50 mM BICINE (Sigma Co.), pH 8.5; 80 mM NaCl. Unlike the wild type, this was a protein without sugar side chains and, thus, it had a neutral pI value. This prevents the nonspecific interactions, such as with cells, which occur in the basic wild type protein. The cross linker was dissolved in a concentration of 15 mM DMSO (kept at -80°C). 2.5 mg of avidin were reacted with a triple molar surplus of cross linker for two hours at room temperature. The reaction was halted by adding tris buffer pH 8.0. The reaction batch was transferred by a gel filtration through a G-25 desalination column (FPLC) in 50 mM MOPS pH 7.4; 80 mM NaCl, thereby removing the excess cross linker. According to the manufacturer's instructions, the protein concentration of the column fractions was determined with the Bio-Rad Protein Assay Kit I (Bio-Rad, Munich) and then the number of coupled linkers per molecule was determined photometrically by standard methods through reduction of a portion of the modified protein. The number found was 1.9 linkers per avidin molecule.

The two proteins were at first coupled in order to detect the incorporation of avidin in neuroblastoma cells through the heavy chain. For this, 1 nmol (= 60 µg) of the modified avidin was incubated with 192 pmol (= 19.2 µg) of the heavy chain of tetanus toxin in 50 mM MOPS buffer, pH 7.4 and 80 mM NaCl at 4°C for 3 days. The reaction batch was broken up in a Superdex-200 gel filtration column, equilibrated with 50 mM CHES pH 9.5 and 1.5 M NaCl. 100 µl samples from the first peak fractions were used for immunofluorescence experiments.

For this experiment, the neuroblastoma cell line HDN-16 was prepared. On the day prior to the experiment, the cells were planted on uncoated slide cover glasses (diameter 1 cm) and coated with 4 ml of medium each in 6-aperture vessels (each aperture 3.5 cm in diameter). Before the start of the experiment, the cells were washed with medium in order to remove dead cells. Next, the cells were placed in 1 ml RPMI-medium (+ 10% FCS) in elution fractions of 100 µl each and incubated motionless for 5 h. All of the immunofluorescence steps were carried out at room temperature. At the end of the incubation time, the cells were washed with abundant medium and then directly fixed.

Both the primary (anti-avidin, rabbit, 2 µg/ml; Rockland, Gilbertsville, USA) and secondary antibodies (goat-anti-rabbit-CY-2; 3.3 µg/ml; Rockland, Gilbertsville, USA) were prepared with the dilution solution (PBS, 0.1% BSA).

The volume was 50 µl. This solution was placed in a 6-aperture vessel and the cover glasses were placed with the cell side on it. The incubation time was at least 30 min., after which the cells were washed with plenty of PBS.

To stain the cell nucleus, the cells were incubated for 10 min. with a Dapi solution (5 ng/ml in 2 x SSC) and then washed with PBS.

On a slide, 15 µl of the mounting medium was placed (2.4 g mowiol in 6 mg glycerin, 1 h stirring, + 6 ml H₂O, 2 h stirring + 12 ml 0.2 M Tris-HCl, pH 8.5, 50°C with

occasional stirring, centrifugation: 5000 g for 15 min., addition of 23 mg/ml DABCO; keeping of 1 ml fractions at -20°C) and the cover glasses were slowly placed on it with the cell side to avoid air bubbles. The slides were kept overnight in the dark and in horizontal position, in order for the polymerization to be completed. The solidified mounting medium preserves the preparation and the Dabco is supposed to prevent fading of the stain during fluorescent microscopy. It was possible to keep the specimens for several weeks at 4°C.

The specimens were evaluated with a Zeiss Axiophot Epifluorescent Microscope. The photographs were taken with a CCD camera CH250 from the Photometrics Company (Munich) and documented with the image processing software IPLab-Spectrum 10 (Ver. 3.0).

The distinct avidin signals can be seen in figure 1. Control batches with a) avidin, b) the heavy chain and c) a batch with unmodified avidin and the heavy chain in the concentration of the elution fraction, produced no signals (data not shown).

This experiment furnished evidence that it is possible to transport other proteins into neuroblastoma cells with the heavy chain of tetanus toxin.

Example 5: Binding of biotin-oligonucleotides to the heavy chain-avidin conjugate

In other batches, the heavy chain was to be coupled to the modified avidin so as to bind DNA oligonucleotides (a 15-mer with random sequence, MWG Biotech Co., Munich) to these conjugates. For this, 1 nmol (= 100 µg) of the heavy chain of tetanus toxin was shaken with 500 µmol (= 30 µg) of the modified avidin (neutrAvidin, Pierce Co., Rockford, USA) in 50 mM Hepes pH 8.5 and 150 mM NaCl for 6 h at room temperature. After this, 50 µmol of a 15-mer DNA oligonucleotide was added and the batch was incubated motionless overnight at 4°C. The oligonucleotides had a biotin group at their 3'-end, enabling a binding to avidin. At the 5'-end, the oligonucleotides were modified with a FITC group, in order to demonstrate any uptake into cells. The modifications of the oligonucleotides were introduced by the manufacturer during the synthesis (MWG Biotech Co., Munich).

Although avidin was present in a tenfold molar excess in the batches and there were theoretically four biotin binding sites for each avidin, any free oligonucleotides still present were to be removed from the batches in order to minimize experimental artifacts. For this, the batches were either incubated with magnetic beads, coupled to streptavidin, or separated on a NickSpin Column (Pharmacia). In the first case, the streptavidin beads were equilibrated with 50 mM Hepes pH 7.4; 150 mM NaCl, the batches were added and shaken for 15 min. After the magnetic separation of the beads, the batch was removed. The NickSpin columns, which had a Sephadex G-50 matrix, were equilibrated with the same buffer and the batches were separated according to the manufacturer's instructions. Both specimens were used during the immunofluorescence experiments (similar to Example 4), yet revealed no significant difference in the signal pattern (cf. Figure 1.)

EXAMPLE 6: Uptake of the HisΔMG-1-HCH fusion protein into neuroblastoma cells

The homogeneously isolated fusion protein consisting of a shortened HMG-1 protein and the heavy chain of tetanus toxin was incubated with the neuroblastoma cell line IMR-

32, in order to test for the uptake of the protein by immunofluorescent assay. After four hours incubation of around 0.5 µg of the fusion protein in 1.5 ml of RPMI medium (+ 10% FCS), the cells were washed with plenty of medium, fixed, and the fusion protein was detected by means of antibodies against the C-fragment of the tetanus toxin (1:100-1:300; Charles River Co., Southbridge, USA) and a CY-2 labeled secondary antibody (goat-anti-rabbit-CY-2, Rockland Co., Gilbertsville, USA). Figure 2 shows the outcome of the experiment. Very strong signals are noticed in nearly all cells.

Patent Claims

1. Conjugate for introduction of active substances into neuronal cells, wherein the conjugate comprises the heavy chain of a toxin of the genus Clostridium and at least one active substance, while the light chain of the toxin is absent.
2. Conjugate per Claim 1, wherein the toxin of genus Clostridium is tetanus toxin or botulinus toxin.
3. Conjugate per Claim 1 or 2, wherein the active substance is selected from among (poly)peptides, proteins, nucleic acids or chemical compounds.
4. Conjugate according to one of Claims 1 to 3, wherein the active substance and the heavy chain of the toxin are joined together by a linker.
5. Conjugate per Claim 4, wherein the linker is NHS-SS-biotin, NHS-iminobiotin or sulfo-LC-SPDP.
6. Conjugate according to one of Claims 1 to 5, wherein the heavy chain of the toxin is present as a fusion protein.
7. Conjugate per Claim 6, wherein the fusion component is a basic protein, preferably human HMG-1 protein.
8. Method for the preparation of a conjugate according to one of Claims 1-7, wherein the active substance, the heavy chain of a toxin of the genus Clostridium, and possibly a linker are reacted together.
9. Kit comprising one or more of the following components:
 - (a) the heavy chain of a toxin of genus Clostridium;
 - (b) conventional adjuvants like carriers, buffers, solvents, controls, etc.
10. Use of the conjugate according to one of Claims 1-7 for accumulation in neuronal cells.
11. Use of the conjugate per Claim 10 for treatment and/or therapy of neuronal diseases.
12. Use of the conjugate per Claim 10 or 11 for gene therapy treatment of neuroblastoma tumors.

[plus 2 pages of figures]

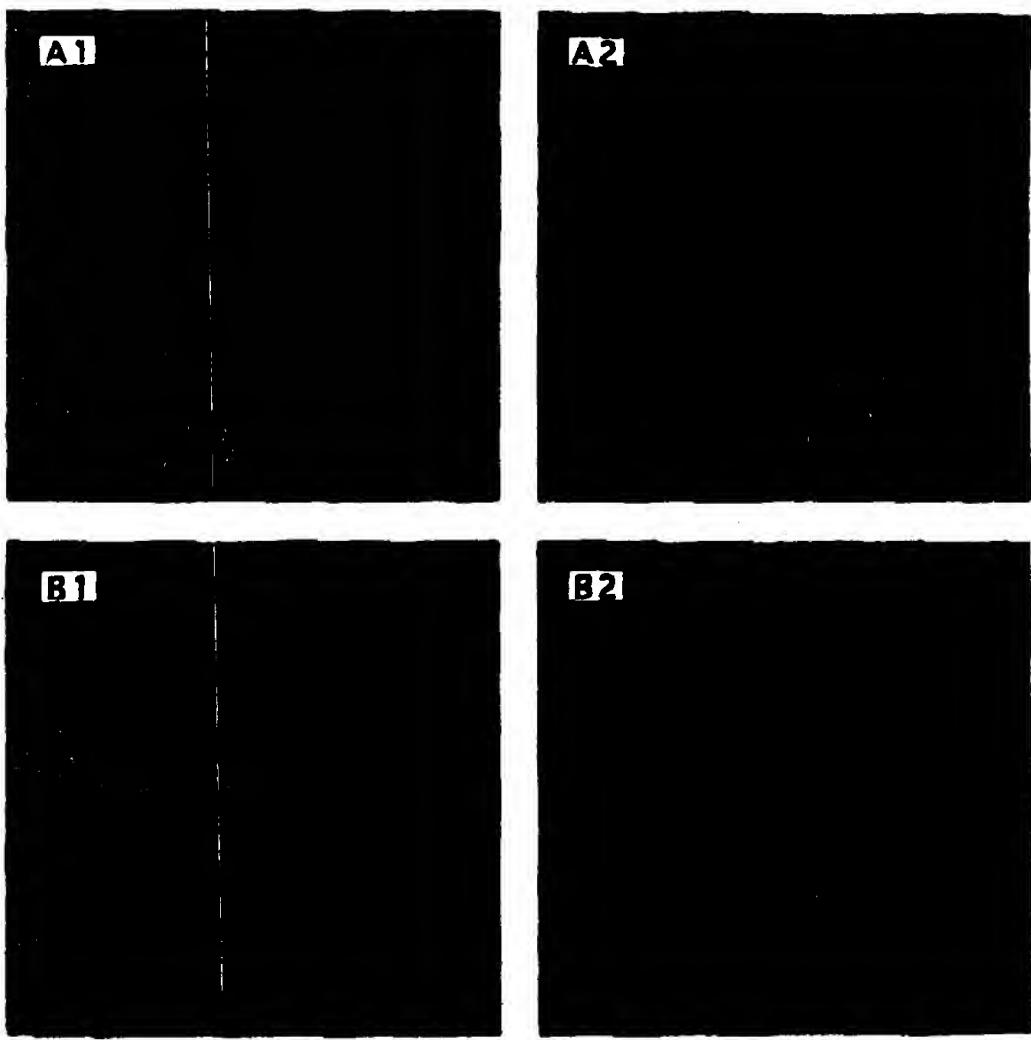


Figure 1

Uptake of conjugates in neuroblastoma cells. **A1:** Dapi nuclear staining of HDN-16 cells of figure A2. **A2:** Avidin signals of HDN-16 cells that were incubated with a conjugate consisting of the heavy chain of tetanus toxin and avidin. Avidin was detected by a FITC-labeled secondary antibody recognizing a specific avidin antibody. **B1:** Propidium iodide nuclear staining of the Kelly cells of figure B2. **B2:** FITC signal of oligonucleotides for Kelly cells that were incubated with a conjugate consisting of the heavy chain of tetanus toxin, avidin, and biotinylated oligonucleotides (FITC labeled).

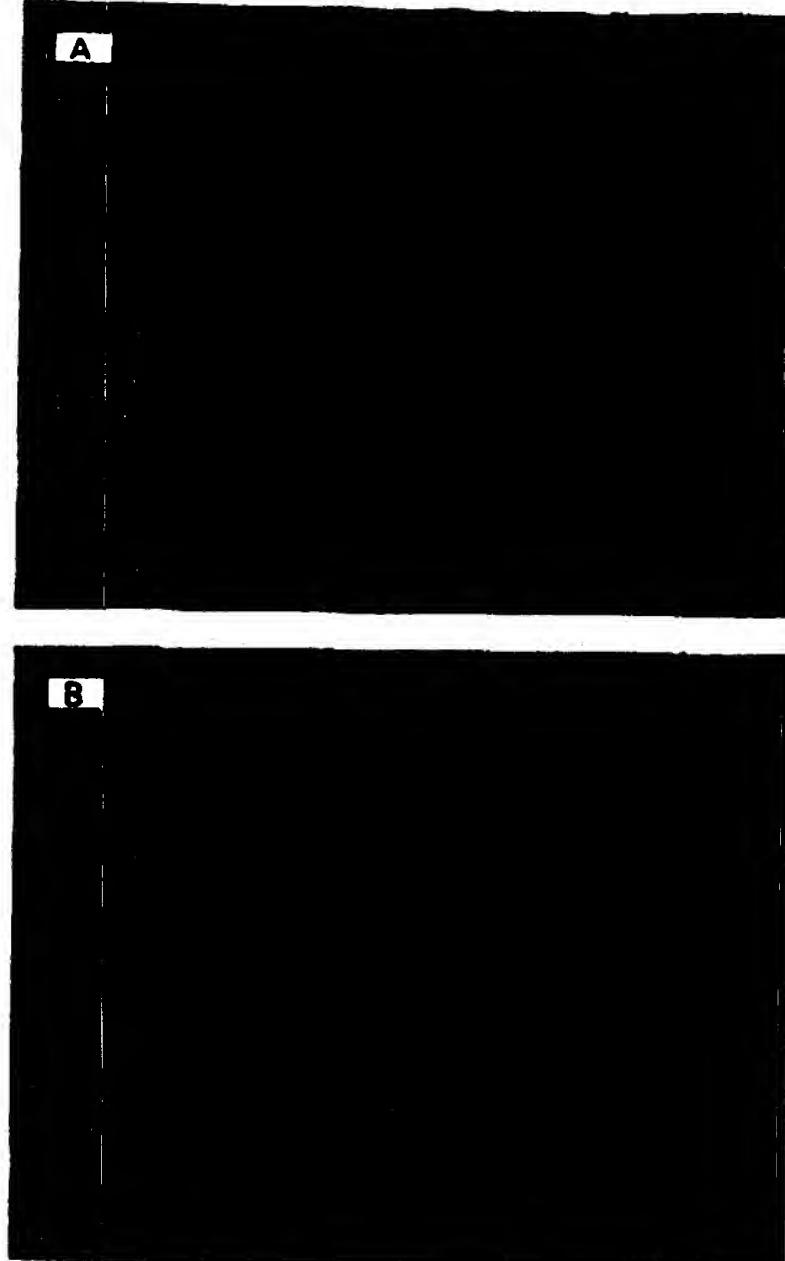


Figure 2

Demonstration of the uptake of the *full length* fusion protein consisting of the shortened HMG-1 protein and the heavy chain of tetanus toxin into the neuroblastoma cell line IMR-32.

A: Dapi nuclear staining of the cells of figure B.

B: Demonstration of the fusion protein by a polyclonal antibody against the C-fragment of the heavy chain of tetanus toxin and a CY-2 labeled secondary antibody.